

KEVERT AHG (NYÚL) POLISPECIFIKUS ANTI-IgG ÉS ANTI-C3d HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

AHG Elite (Clear vagy Green): Antiglobulin módszerekhez.

ÖSSZEFOGLALÁS

1945-ben Coombs, Mourant és Race leírta az AHG szérum felhasználását a vörösvérsejtekhez kötött nem agglutináló antitestek kimutatására. 1957-ben Dacie és munkatársai kimutatták, hogy az antiglobulin-szérumokban található antitestek a komplement rendszer bizonyos összetevői ellen irányulnak. Az AHG reagensek kimutatják a nem agglutináló antitest-molekulákat, valamint a komplement rendszer vörösvérsejtekhez kötött molekuláit az *in vivo* vagy *in vitro* antigén-antitest reakciókat követően.

FELHASZNÁLÁSI TERÜLET

Ezek a reagensek polispecifikus vércsoport-meghatározó reagensek, amelyek célja a szenzibilizáló IgG antitestek (mind a négy alosztály) és a C3d és C3b komplement faktorok jelenlétének vagy hiányának kvalitatív kimutatása a humán vörösvérsejteken, a jelen használati útmutatóban ismertetett ajánlott módszerekkel vizsgálva.

ALAPELV

A reagensek a humán vörösvérsejteken lévő humán IgG antitestek és C3 komplement faktorok (C3d és C3b) elleni antitesteket tartalmaznak, és a humán IgG antitestekkel és/vagy C3 komplement faktorokkal (C3d és C3b) szenzibilizált vörösvérsejtek közvetlen agglutinációját (összecsapódását) okozzák. Az agglutináció hiánya általában a szenzibilizáló humán IgG antitestek és C3 komplement faktorok (C3d és C3b) hiányát jelzi a humán vörösvérsejteken (lásd a **Korlátok** című részt).

REAGENSEK

A Lorne AHG Elite Clear és AHG Elite Green reagensek nyúlból származó, nonspecifikus aktivitással rendelkező, adszorpcióval eltávolított anti-IgG-t és egér monoklonális IgM anti-C3d-t (BRIC-8 klón) tartalmaznak. Az antitestek szarvasmarha albumint tartalmazó pufferelt oldatban vannak hígítva. A reagensek nem tartalmaznak CMR (rákkeltő, mutagén vagy reprodukciót károsító) anyagokat, endokrin rendszert káros anyagokat, illetve olyan anyagokat, amelyek a felhasználónál szenzibilizációt vagy allergiás reakciót okozhatnak. Az egyes reagenseket az alábbiakban felsorolt összes ajánlott módszerrel való használathoz optimális hígításban szállítják, további hígítást vagy kiegészítést nem igényelnek. A tétel referenciaszámát és lejárati dátumát lásd az **üveg címkéjén**.

Reagens	Sejtvonal/klón	Szín	Felhasznált festék
AHG Elite Clear	Nyúl anti-humán IgG BRIC-8 (Anti-C3d)	Színtelen	Nincs
AHG Elite Green	Nyúl anti-humán IgG BRIC-8 (Anti-C3d)	Zöld	Patentkék és tartrazin

TÁROLÁS

A reagensüvegeket a kézhezvételüket követően 2–8 °C-on kell tárolni. A megadott hőmérséklet-tartományon kívüli, hosszabb ideig történő tárolás felgyorsíthatja a reagens reakcióképességének elvesztését. A reagensen 37 °C-on és –25 °C-on szállítási stabilitási vizsgálatot végeztek a BS EN ISO 23640:2015 dokumentumban leírtak szerint.

MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A mintákat aseptikusan kell gyűjteni EDTA-ban az *in vitro* komplementkötések megakadályozása érdekében, és a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni. Ha EDTA nem érhető el, az ACD-be, CPD-be vagy CPDA-1-be vett mintavétel javasolt az alvadt minták helyett. Ha csak alvadt minták állnak rendelkezésre, akkor a vizsgálat előtt ne hűtse őket.

ÓVINTÉZKEDÉSEK

- A reagensek kizárólag *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szolgálnak.
- Ha a reagensüveg megrepedt vagy szivárog, azonnal dobja ki a tartalmát.
- Ne használja a reagenseket a lejárati dátumot követően (lásd az **üveg címkéjét**).
- Ne használja a reagenseket csapadék jelenléte esetén.
- A reagensek kezelésekor védőruházatot, például eldobható kesztyűt és laboratóriumi köpenyt kell viselni.
- A biológiai terhelés csökkentése érdekében a reagenseket 0,2 µm-es kapszulán átszűrtek, de nem sterilén szállítják. Az üveg felnyitása után a tartalomnak a lejárati dátumig működőképesnek kell maradnia, mindaddig, amíg nincs benne látható zavarosság, amely a reagens károsodását vagy szennyeződését jelezheti.
- A reagensek < 0,1% nátrium-azidot tartalmaznak. A nátrium-azid lenyelve mérgező lehet, illetve az ólom- és rézvezetékkel reakcióba léphet és

robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet. Ártalmatlanításakor nagy mennyiségű vízzel öblítse le.

- A termékek előállításához használt anyagokat a forrásnál megvizsgálták, és jóváhagyott mikrobiológiai vizsgálatokkal negatívnak találták HIV 1+2 és HCV antitestek, valamint HBSAg szempontjából.
- Egyetlen ismert vizsgálat sem tudja garantálni, hogy az emberi vagy állati eredetű termékek fertőző ágensektől mentesek. Az üvegek és azok tartalmának használatakor és ártalmatlanításakor óvatosan kell eljárni.

A REAGENS ÁRTALMATLANÍTÁSA ÉS A KIÖMLÖTT ANYAGOK KEZELÉSE

A reagensek ártalmatlanításával és a kiömléssel érintett terület szennyeződésmentesítésével kapcsolatos információkat lásd a kérésre rendelkezésre álló **anyagbiztonsági adatlapokban**.

KONTROLLOK ÉS TANÁCSOK

- Javasolt az egyes vizsgálati tételekkel párhuzamosan egy pozitív (gyenge anti-D <0,1 NE/ml) és egy negatív (egy semleges szérum) kontroll vizsgálata. A vizsgálatokat érvénytelennek kell tekinteni, ha a kontrollok nem a várt eredményeket mutatják.
- Az antiglobulin módszerek csak akkor tekinthetők érvényesnek, ha az összes negatív teszt pozitívan reagál az IgG-szenzibilizált vörösvérsejtekkel.
- Használat előtt hagyja a reagenst szobahőmérsékletre felmelegedni. Használat után a reagenst azonnal tegye vissza 2–8 °C-on történő tárolásra.
- Az **Ajánlott módszerek** című részben egy térfogat körülbelül 50 µl az üveghez mellékelte cseppentő használata esetén.
- A reagensek használatát és az eredmények értelmezését megfelelően képzett és képezített személyzetnek kell végeznie annak az országnak a követelményeivel összhangban, ahol a reagenseket használják.
- A felhasználónak kell meghatároznia a reagensek más módszerekkel végzett felhasználásra való alkalmasságát.

SZÜKSÉGES REAGENSEK ÉS ANYAGOK

- Coombs sejtmosó.
- Üveg kémcsövek (10 x 75 mm-es vagy 12 x 75 mm-es).
- IgG-szenzibilizált vörösvérsejtek, pl. Lorne Coombs Control Cells (katalógusszám: 970010).
- Semleges antitest, például Lorne Inert AB Serum (katalógusszám: 110010).
- Alacsony ionerősségű oldat (LISS): 0,03 M NaCl-t, 0,003 M Na₂HPO₄: NaH₂PO₄ puffert (6,7-es pH, 22 °C ± 1 °C-on) és 0,24 M glicint tartalmaz.
- PBS-oldat (pH 6,8–7,2) vagy izotóniás sóoldat (pH 6,5–7,5).
- Volumetrikus pipetták.
- 37 °C ± 2 °C-ra kiegyenlített vízfürdő vagy száraz fűtőinkubátor.
- Gyenge anti-D, pl. Lorne Precise Weak Anti-D (katalógusszám: 209005).

AJÁNLOTT MÓDSZEREK

A. Direkt antiglobulin módszer (DAT)

- Mosson át 1 térfogat vörösvérsejtet (2-3%-os szuszpenzió PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban) négyszer PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal, ügyelve arra, hogy a mosások között dekantálja a sóoldatot, és minden mosás után szuszpendálja újra a sejteket. Az utolsó mosás után teljesen dekantálja a sóoldatot.
- Adjon 2 térfogat Lorne AHG Elite-et minden száraz sejttöledékhez.
- Alaposan keverje össze, majd centrifugálja az összes csövet 20 másodpercig 1000 rcf-en vagy annak megfelelő, eltérő idő és erő alkalmazásával.
- Óvatosan szuszpendálja újra a vörösvérsejt-üledéket, és makroszkóposan olvassa le az agglutinációt.

B. Indirekt antiglobulin módszer (NISS IAT)

- Készítsen 2-3%-os vörösvérsejt-szuszenziót PBS-ben vagy izotóniás sóoldatban.
- Tegyen egy felcímkézett kémcsőbe: 2 térfogat vizsgálati szérumot és 1 térfogat vörösvérsejt-szuszenziót.
- Alaposan keverje össze, és inkubálja 37 °C-on 15 percig.
- Mossa át a vörösvérsejteket négyszer PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal, ügyelve arra, hogy a mosások között dekantálja a sóoldatot, és minden mosás után szuszpendálja újra a vörösvérsejt-üledéket. Az utolsó mosás után teljesen dekantálja a sóoldatot.
- Adjon 2 térfogat Lorne AHG Elite-et minden száraz sejttöledékhez.
- Alaposan keverje össze, majd centrifugálja az összes csövet 20 másodpercig 1000 rcf-en vagy annak megfelelő, eltérő idő és erő alkalmazásával.

- Óvatosan szuszpendálja újra a vörösvérsejt-üledéket, és makroszkóposan olvassa le az agglutinációt.

C. LISS indirekt antiglobulin módszer (LISS IAT)

- Készítsen 1,5-2%-os vörösvérsejt-szuspenziót LISS-oldatban.
- Tegyen egy felcímkézett kémcsőbe: 2 térfogat vizsgálati szérumot és 2 térfogat vörösvérsejt-szuspenziót.
- Alaposan keverje össze, és inkubálja 37 °C-on 15 percig.
- Kövesse a NISS IAT fenti 4–7. lépését.

A VIZSGÁLAT EREDMÉNYEINEK ÉRTELMEZÉSE

- Pozitív:** A vörösvérsejtek agglutinációja pozitív vizsgálati eredményt jelent, és a vizsgálati eljárás elfogadott korlátain belül az IgG és/vagy a komplement (C3d/C3b) jelenlétét jelzi a vörösvérsejteken.
- Negatív:** A vörösvérsejtek agglutinációjának hiánya negatív eredményt jelent, és a vizsgálati eljárás elfogadott korlátain belül az IgG és/vagy a komplement (C3d/C3b) hiányát jelzi a vörösvérsejteken.

A REAKCIÓK STABILITÁSA

- A mosási lépéseket megszakítás nélkül végezze el, majd centrifugálja és olvassa le a vizsgálatokat azonnal a reagens hozzáadása után. A késlekedés az antigén-antitest komplexek disszociációját eredményezheti, ami hamis negatív vagy gyenge pozitív eredményekhez vezethet.
- Az **ajánlottól** eltérő hőmérsékleten végzett vizsgálatok eredményeinek értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

KORLÁTOK

- Az IgG-bevonat miatt pozitív DAT-tal rendelkező vörösvérsejteket nem lehet tipizálni az **indirekt antiglobulin módszerekkel**.
- A komplement szenzibilizálása miatti pozitív DAT nem feltétlenül tükröz *in vivo* komplementfixációt, ha a vizsgálati sejtek hűtött alvadat mintából származnak.
- Az indirekt antiglobulin módszerekben a vörösvérsejtek nem megfelelő mosása semlegesítheti az AHG reagenst.
- A mosási fázis befejezése után a felesleges maradék sóoldat hígíthatja az AHG Elite-et, csökkentve annak hatékonyságát.
- A direkt antiglobulin vizsgálat negatív eredménye nem feltétlenül zárja ki az újszülöttkori ABO hemolitikus betegség vagy az autoimmun hemolitikus anémia klinikai diagnózisát. Az újszülöttkori hemolitikus betegséget sem feltétlenül zárja ki, különösen, ha gyanítható az ABO-inkompatibilitás.
- Hamis pozitív vagy hamis negatív eredmények a következők miatt is előfordulhatnak:
 - A vizsgálati anyagok szennyeződése
 - Nem megfelelő tárolás, sejtkoncentráció, inkubációs idő vagy hőmérséklet
 - Nem megfelelő vagy túlzott centrifugálás

SPECIÁLIS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

- A forgalomba hozatal előtt minden reagenstételt megvizsgáltak a jelen használati útmutatóban felsorolt ajánlott vizsgálati módszerekkel anti-D-vel, anti-K-vel és anti-Fy^a-val bevont vörösvérsejtekkel szemben a megfelelő reaktivitás ellenőrzéséhez. A vizsgálatok megfeleltek a „Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom” (Vértranszfúziós szolgáltatásokra vonatkozó irányelvek az Egyesült Királyságban) jelenlegi verziójában/kiadásában meghatározott vizsgálati követelményeknek.
- Az anti-IgG és az anti-C3d hatékonyságát a National Institute of Biological Standards and Controls-tól (Nemzeti Biológiai Szabványügyi és Ellenőrzési Intézet, NIBSC) kapott alábbi minimális hatékonysági referenciaszabvány alapján vizsgálták meg:
 - Anti-AHG referenciaszabvány 96/666
- Az anti-C3d hatékonyságát C3d-vel és C3b-vel bevont sejteket alkalmazó vizsgálatokkal demonstrálták.
- A szennyező heterospecifikus agglutininek vagy C4d elleni antitestek jelenlétét kizárták az összes ABO-csoport vörösvérsejtjeit és C4d-vel bevont sejteket alkalmazó vizsgálatokban.
- Az esetlegesen jelen levő anti-IgM, anti-IgA vagy anti-könnyűlánc összetevők reaktivitását nem állapították meg.
- A reagensok minőség-ellenőrzését olyan vörösvérsejtekkel végezték, amelyek fenotípusait egy egyesült királyságbeli vértranszfúziós központban igazolták, és amelyeket felhasználás előtt PBS-sel vagy izotóniás sóoldattal mostak.

NYILATKOZAT

- A felhasználó felelős a reagens teljesítményéért, ha azokat az **Ajánlott módszerek** című részben említettekől eltérő módszerekkel használják.
- Az **Ajánlott módszerek** című résztől való bármilyen eltérést használat előtt validálni kell⁶.

IRODALOMJEGYZÉK

- Voak D, Downie DM, Moore BPL, and Engelfreit CP. Anti-Human Globulin reagent specification. The European and ISBT/ICSH View. Biotest Bulletin 1: 7-22 (1986).
- The Department of Health and Social Security. Health Services Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625 Nov 1983.
- Bruce M, Watt AH, Hare W, Blue A, Mitchell R. A serious source of error in antiglobulin testing. Transfusion 1986; **26**: 177-181.
- Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfreit CP, Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in AHG (AHG) tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 1988; **21**(1): 3-16.

- Guidelines for the Blood Transfusion Service in the United Kingdom, 6th Edition 2002. The Stationary Office.
- British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross matching. Transfusion Medicine, 1995, **5**, 145-150.

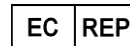
RENDELKEZÉSRE ÁLLÓ REAGENSMERETEK

	Üveg méret	Katalógusszám	Vizsgálatok üvegenként
Lorne AHG Elite (Clear)	10 ml	415010	100
	1000 ml	415000*	10 000
Lorne AHG Elite (Green)	10 ml	435010	100
	1000 ml	435000*	10 000

*Ez a méret csak további gyártási célú felhasználásra (For Further Manufacturing Use, FFMU) szolgál, és ezért nincs CE-jelöléssel ellátva.



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Egyesült Királyság
Telefon: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
E-mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Málta